

· 论著 ·

皮肤角质形成细胞中 TRPV1 受体激活后的蛋白质组差异分析

黄瑾, 王建, 袁芳, 胡文娟(上海市浦东新区人民医院药剂科, 上海 201200)

[摘要] 目的 研究皮肤角质形成细胞中辣椒素受体 TRPV1 激活后细胞中蛋白质组学的变化, 并鉴定差异蛋白质。方法 皮肤角质形成细胞株 HaCaT 细胞经辣椒素(CAP)刺激 24 h 后, 提取蛋白样品, 采用双向凝胶电泳技术分离 HaCaT 细胞总蛋白, 用 PDQuest 软件分析对照组和 CAP 刺激组蛋白组图谱的表达差异点, 再运用串联飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定差异蛋白。结果 CAP 刺激 HaCaT 细胞后, 磷酸甘油醛异构酶、烯醇化酶、6-磷酸葡萄糖酸内酯酶和组织蛋白酶 D 蛋白表达水平增高, 角蛋白 14 和 60S 酸性核糖体蛋白 P2 表达量降低, 这些蛋白可能在 TRPV1 激活后影响细胞功能的过程中有重要作用。结论 利用蛋白质组学技术, 研究皮肤角质形成细胞株 HaCaT 细胞中 TRPV1 受体激活后蛋白表达差异, 为研究 TRPV1 受体的作用机制, 以及为研发针对性药物, 提供新的线索和方向。

[关键词] 皮肤角质形成细胞; 辣椒素受体; 双向电泳; 蛋白质组学

[中图分类号] R318.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)05-0334-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.05.004

Differential proteomics analysis of human keratinocytes with transient receptor potential vanilloid-1 activated by capsaicin

HUANG Jin, WANG Jian, YUAN Fang, HU Wen-juan (Department Pharmacy, Pudong New Area People's Hospital, Shanghai 201200, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the differential proteomics of human keratinocytes with transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) activated by capsaicin. **Methods** Human keratinocytes were cultured and treated by capsaicin. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) combined with MALDI-TOF/TOF identification were used to investigate the effect of TRPV1 activation on the proteome of keratinocytes. **Results** Compared with blank control, triosephosphate isomerase (TPI), enolase 1, 6-phosphogluconolactonase, cathepsin D had higher expression in peritoneal macrophages of experimental endometriosis, while keratin 14 and 60 S acidic ribosomal protein P2 expressed lower. **Conclusion** It was revealed that there was a potential mechanism of TRPV1 activation in keratinocytes, which gave a new sight to find targets and screen drugs in skin disorders.

[Key words] transient receptor potential vanilloid-1; human keratinocytes; capsaicin; two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

辣椒素受体 TRPV1 (transient receptor potential vanilloid-1, TRPV1) 是表达于外周初级传入神经元上重要的伤害感受器, 参与了急性炎症痛敏的形成^[1, 2]。研究表明, 辣椒素激活 (TRPV1) 后, 钙离子通道开放, 钙离子内流, 胞质中钙离子浓度升高, 引起神经元及其纤维释放神经肽, 如 P 物质、神经激肽 A、降钙素基因相关肽、血管活性肠肽和兴奋性氨基酸等。辣椒素受体 (TRPV1) 可以被内源性、外源性香草醛类物质、热刺激、酸、炎症刺激和组织损伤等激活。近来研究发现, TRPV1 不仅存在于神经元细胞, 还广

泛存在于非神经细胞上^[3, 4], 例如呼吸道上皮细胞, 心肌细胞, 膀胱上皮细胞, 胃壁上皮细胞和角质形成细胞。有研究表明, 活化人表皮角质形成细胞中 TRPV1 受体能直接导致环氧酶-2 (COX-2) 的释放^[5]。这个发现说明 TRPV1 受体可能在角质形成细胞等非神经细胞分泌炎症因子参与炎症反应过程中发挥重要作用, 而其参与诱导致炎因子和缓激肽等炎症介质的分泌表达, 会进一步加重炎症反应并刺激末梢神经产生痛感。因此, 角质形成细胞中 TRPV1 受体的功能, 尤其是在皮肤神经网络中的作用日益受到重视, 被看作是开发抗炎和镇痛药物的新靶点^[6]。针对 TRPV1 受体的药物研究也将为局部镇痛及皮肤炎症性疾病的治疗带来新的前景。

蛋白质组学技术是一种立体、全面、快速分析胞内蛋白差异表达的重要方法。尽管近年来生物质谱

[基金项目] 上海市自然科学基金 (12ZR1438500); 浦东新区卫生局基金 (PW2013A-12)。

[作者简介] 黄瑾 (1974-), 男, 博士, 主管药师。Tel: (021) 58921995, E-mail: john70550@163.com。

技术、色谱技术及生物信息学等学科取得了巨大进步,为高通量的蛋白质组学研究拓展了新的方向,但是双向凝胶电泳技术仍然是目前蛋白质组学研究的主要方法,也是目前唯一可以在一块凝胶上同时分离数千乃至上万个蛋白质的方法。

本实验利用双向凝胶电泳方法,研究皮肤角质形成细胞中 TRPV1 受其配体辣椒素 (capsaicin, CAP) 刺激后,细胞内蛋白质组的变化。通过差异蛋白扫描和质谱鉴定,发现 TRPV1 活化后的差异表达的蛋白,进一步解释 TRPV1 受体在皮肤角质形成细胞中的作用机制,为研发针对性药物提供新的线索和方向。

1 材料和方法

1.1 细胞株 人角质形成细胞株 HaCaT 由第二军医大学长海医院皮肤科顾军教授惠赠。辣椒素 (CAP), 购自中国药品生物制品检定所。

1.2 试剂与仪器 DMEM 培养基 (GIBCO 公司); 胎牛血清 (Hyclone 公司)。IPG 胶条 (ReadyStrip IPG Strip, 17 cm, pH 3-10)、双向电泳起始试剂盒/上样缓冲液 (Ready-Prep 2-D Starter Kit Rehydration/Sample Buffer)、矿物油、蛋白纯化试剂盒、蛋白定量试剂盒 (RC DC Protein Assay Kit) 均为 Bio-Rad 公司产品; 蛋白酶抑制剂 (Roche 公司); 其他试剂均为化学分析纯。双向凝胶电泳第一向等电聚焦仪、第二向聚丙烯酰胺凝胶系统、GS800 扫描仪为 Bio-Rad 公司产品; 双向凝胶电泳图像分析软件使用 PDQuest 2D Analysis software 7.4.0 (Bio-Rad); 质谱仪为 4700 串联飞行时间质谱仪 [4700 Proteomics Analyzer (TOF/TOFTM), Applied Biosystems, USA]; Millipore 纯水仪 (Millipore 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与给药 将常规培养的 HaCaT 细胞以 2×10^6 /ml 传入 60 mm 细胞培养皿, 在 37 °C 孵箱中孵育过夜, 一组为空白对照组, 另一组加入 CAP (2 μ M) 刺激。24 h 后收集细胞蛋白样品, 加入细胞蛋白裂解缓冲液 (含蛋白酶抑制剂) 冰上裂解 10 min, 收集样品, 4 °C 条件下 20 000 r/min, 离心 30 min。取上清, 使用蛋白纯化试剂盒纯化蛋白样品, 用 Bradford 法进行蛋白定量。然后将处理好的蛋白样品分装至 Eppendorf 管于 -80 °C 保存备用。

1.3.2 双向电泳 取 400 μ g 蛋白样品上样于 IPG 胶条, 加入矿物油, 覆盖整个胶条表面。设置第一向等电聚焦电泳条件: 被动水化 7 h; 50 V, 3 h; 250 V, 3 h; 1 000 V, 2 h; 线性升压到 10 000 V; 快速聚焦 60 000 V/hr, 最后 500 V 保持。待 IEF 结

束, 将胶条取出, 用滤纸吸干多余水分和矿物油, 放在平衡缓冲液 I (6 mol/L 尿素, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris, 20% 甘油, 2% DTT) 中平衡 10 min, 再在平衡缓冲液 II (6 mol/L 尿素, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris, 20% 甘油, 2.5% IAA) 中平衡 10 min。将平衡后的胶条转移至 12% 聚丙烯酰胺凝胶上端, 进行 SDS-PAGE 电泳分离。电泳完毕后将凝胶取出, 进行固定, 用银染法进行染色。

1.3.3 图像采集分析 银染的凝胶用 GS-800 扫描仪扫描, 获得的蛋白质点图像用 PDQuest 图像分析软件依次进行蛋白质斑点位置坐标检测、背景消减、手工加减点、差异蛋白点的分析等, 量化获取斑点的相关信息, 建立平均凝胶等分析。笔者中从细胞模型到样品制备, 分别进行了 3 次双向电泳实验。每次双向电泳的图谱进行两两比对分析, 寻找 2 组细胞样品的差异表达蛋白。

1.3.4 MALDI-TOF-MS 鉴定差异蛋白质 本实验采用串联飞行时间质谱鉴定差异蛋白点。选取两组中表达有差异的蛋白质点, 将胶切下, 经胰蛋白酶水解后得到该蛋白质的多肽片段混合物, 用 4700 串联飞行时间质谱仪进行质谱分析, 激光源为 355 nm 波长的 Nd: YAG 激光器, 加速电压为 20 kV, 采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据。随后, 直接选择与对照基质的 PMF 图有差异的肽段离子进行 MS/MS 分析。最后, 选用 Mascot 软件检索 NCBI 人类蛋白序列数据库鉴定蛋白质。

2 实验结果

2.1 CAP 刺激 HaCaT 细胞后蛋白质组双向电泳凝胶图谱 通过优化的双向凝胶电泳条件, 获得了分辨率高、背景清晰的双向凝胶银染图。图 1 A 为溶剂对照处理 24 h 后 HaCaT 细胞总蛋白的双向凝胶电泳图谱, 其中一向采用 pH 值 3 ~ 10、长 17 cm 的非线性固相 IPG 胶条, 二向为 12% SDS-PAGE。B 为 CAP (2 μ M) 处理 24 h 后, HaCaT 细胞总蛋白的双向凝胶电泳图谱, 上样量以及电泳条件与溶剂对照组相同。

2.2 双向凝胶电泳图像差异分析 利用 PDQuest 分析软件对 CAP 处理组和对照组的双向凝胶电泳图谱进行差异分析。对照组蛋白点总数为 (918 \pm 55), 而 CAP 处理组蛋白点总数为 (1 102 \pm 46)。其中, 有 65 个蛋白仅在 CAP 刺激组中出现, 有 23 个蛋白仅在对照组细胞中出现。差异 2 倍以上的蛋白质点被认为是表达有差异, 比较两组之间的平均凝胶图谱发现, 有 338 个蛋白点在两组细胞中均存在。选取部分分辨清楚, 差异明显的蛋白质放大图像见图 2。

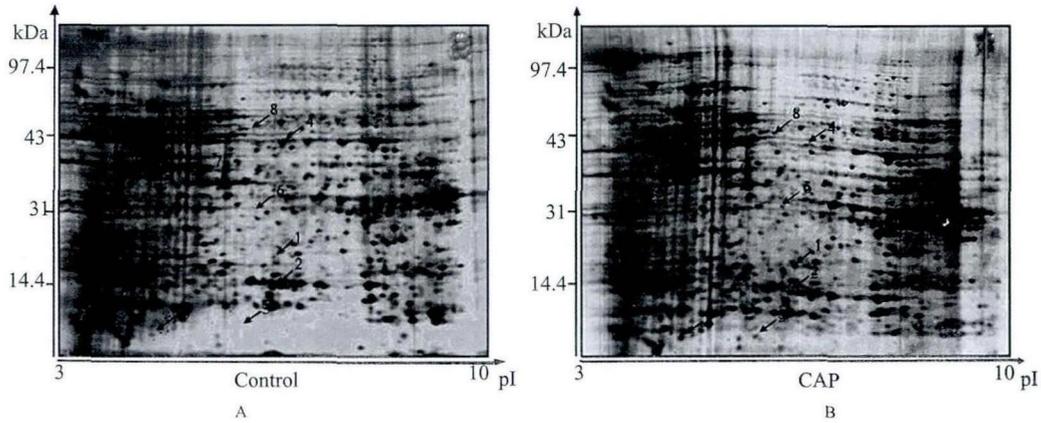


图1 双向电泳图谱

A-空白对照组;B-CAP(2 μ M)刺激 HaCaT 细胞 24 h 后的处理组。纵横轴分别代表蛋白质的等电点(pI)和分子量(Mr);差异显著的蛋白以箭头指出

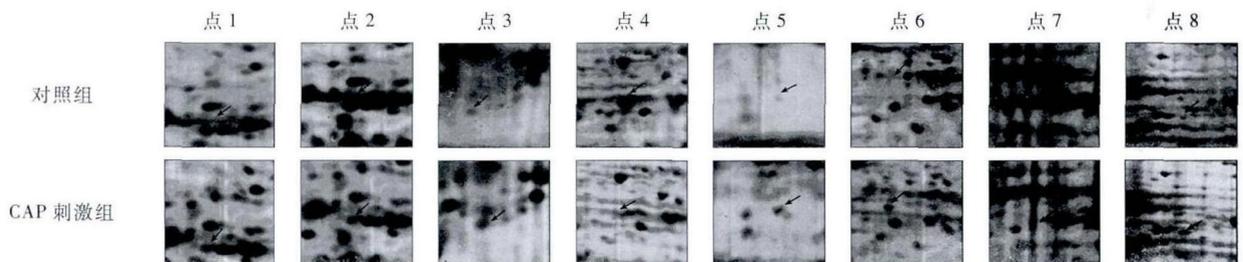


图2 差异显著点放大图

2.3 MALDI-TOF-MS 鉴定部分差异蛋白 选取表达量大,且差异显著的蛋白质点进行 MALDI-TOF 质谱分析。经胶内胰酶消化、质谱分析,并将肽质谱数据库提交在线 Mascot,在 NCBI 人类蛋白序列数据库中进行检索。根据 Mascot 软件算法所得积分,结合蛋白点在电泳图上的分子量、等电点信息鉴定差异蛋白。实验结果表明,皮肤角质形成细胞 HaCaT

受辣椒素刺激后,磷酸甘油醛异构酶(triosephosphate isomerase, TPI)、烯醇化酶1(enolase 1)、6-磷酸葡萄糖酸内酯酶(6-phosphogluconolactonase)和组织蛋白酶 D(cathepsin D)表达升高,角蛋白 14(keratin 14)和 60S 酸性核糖体蛋白 P2(60S acidic ribosomal protein P2)表达量降低,这些蛋白可能在 TRPV1 激活后影响细胞功能的过程中有重要作用。

表1 CAP 刺激 HaCaT 细胞后表达差异蛋白

序号	数据库编号	蛋白鉴定	分子量	等电点	蛋白质得分	可信区间
1	gi1136066	磷酸甘油醛异构酶(TPI)	26 609	7.1	72	99.119
2	gi115431310	角蛋白 14	51 589	5.09	92	99.992
3	gi162896593	烯醇化酶 1	47 111	7.01	336	100
4	gi155635097	60S 酸性核糖体蛋白 P2	11 665	4.42	234	96
5	gi16018458	6-磷酸葡萄糖酸内酯酶	27 547	5.58	158	86.14
6	gi154697170	组织蛋白酶 D	42 358	5.72	105	95.05

3 讨论

新近研究表明,角质形成细胞既是皮肤屏障功能的重要执行者,还是各种趋化因子和细胞因子的重要分泌细胞^[7],其生物学功能以往被大大低估了。多项研究表明,TRPV1 参与了炎症和免疫激活的过程^[8]。但在皮肤细胞上的 TRPV1 受体功能研究较少。本课题组前期以皮肤角质形成细胞的 TR-

PV1 为靶点,筛选出对皮肤角质形成细胞有抗炎免疫调节活性的中药成分^[9,10]。

为进一步了解 TRPV1 在皮肤角质形成细胞中的功能和作用机制,本实验用蛋白质组学的方法去寻找 TRPV1 活化后角质形成细胞中蛋白质的表达差异,以寻找更具有针对性的药物靶点。经质谱鉴定表达有差异的蛋白质后,结果表明,磷酸甘油醛异构酶、烯醇化酶 1,6-磷酸葡萄糖酸内酯酶和组织蛋

白酶 D 表达升高,而角蛋白 14 和 60S 酸性核糖体蛋白 P2 表达量降低,这些蛋白可能在 TRPV1 激活后影响细胞功能的过程中发挥重要作用。

磷酸甘油醛异构酶是糖酵解过程中重要的异构酶,存在于多种组织中。它催化二羟丙酮磷酸和 D-甘油醛-3-磷酸(GAP)之间的可逆转化。磷酸甘油醛异构酶缺乏与免疫系统先天失调的多系统疾病以及神经退行性蛋白质错误折叠病有关^[11,12]。有研究发现 I 型糖尿病合并神经改变的病人,其成纤维细胞表达 TPI 基因与对照相似,但蛋白丰度有所增加,提示其酶活性可能降低^[13]。在皮肤角质形成细胞中,受 CAP 活化后磷酸甘油醛异构酶蛋白表达增加,可能与 TRPV1 的免疫调节功能有关。烯醇化酶是催化二磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇丙酮酸的关键酶,在糖酵解过程中有重要作用,同时还与生长调控、缺氧耐受和过敏反应等关系密切。有研究表明,烯醇化酶与系统性自身免疫疾病有关。例如,哮喘病人血液中单核细胞表面烯醇化酶 1 表达增加,有招募炎症细胞聚集的作用^[14]。6-磷酸葡萄糖酸内酯酶是戊糖磷酸途径过程中的一个酶,它将 6-磷酸葡萄糖酸内酯转变为 6-磷酸葡萄糖酸。组织蛋白酶 D 是天冬氨酸蛋白酶,特异性与胃蛋白酶相似,存在于大多数动物组织细胞内,是一种肽键水解酶。组织蛋白酶 D 的高表达与肿瘤细胞的增殖和迁移有关。以上几种酶都是与能量代谢相关的酶,在 TRPV1 激活后出现蛋白表达水平的差异,可能与参与 TRPV1 离子通道开放有关。

角蛋白 14 与皮肤角质形成细胞的活化与增殖密切相关,同时,它还与银屑病的发生发展有关^[15,16]。而 60S 酸性核糖体蛋白 P2,近年来被证实肿瘤的生长与转移过程中起重要作用,有可能成为肿瘤治疗的新靶点^[17,18]。在 TRPV1 活化的角质形成细胞中蛋白表达降低,可减少细胞的生长速度与核糖体的蛋白质翻译效率。

这些表达有差异的蛋白在角质形成细胞 TRPV1 活化后的生物学功能还有待于进一步研究,可为寻找和开发与 TRPV1 相关的抗炎和镇痛药物的研究提供新的思路。

【参考文献】

[1] Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway [J]. *Nature*, 1997, 389: 816.
[2] Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, *et al.* Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor [J]. *Science*, 2000, 288: 306.
[3] Miyamoto R, Tokuda M, Sakuta T, *et al.* Expression and char-

acterization of vanilloid receptor subtype 1 in human dental pulp cell cultures[J]. *J Endod*, 2005, 31: 652.
[4] Gunthorpe MJ, Chizh BA. Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway[J]. *Drug Discov Today*, 2009, 14: 56.
[5] Southall MD, Li T, Gharibova LS, *et al.* Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 304: 217.
[6] Szolcsanyi J. Hot target on nociceptors: perspectives, caveats and unique features[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 155: 1142.
[7] De Benedetto A, Agnihothri R, McGirt LY, *et al.* Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects[J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129(1):14.
[8] Vennekens R, Owsianik G, Nilius B. Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(1):18.
[9] Huang J, Qiu L, Ding L, *et al.* Ginsenoside Rb1 and paeoniflorin inhibit transient receptor potential vanilloid-1-activated IL-8 and PGE2 production in a human keratinocyte cell line HaCaT [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10: 1279.
[10] Huang J, Ding L, Shi D, *et al.* Transient receptor potential vanilloid-1 participates in the inhibitory effect of ginsenoside Rg1 on capsaicin-induced interleukin-8 and prostaglandin E2 production in HaCaT cells[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64: 252.
[11] Eber SW, Pekrun A, Bardosi A, *et al.* Triosephosphate isomerase deficiency: haemolytic anaemia, myopathy with altered mitochondria and mental retardation due to a new variant with accelerated enzyme catabolism and diminished specific activity[J]. *Eur J Pediatr*, 1991, 150: 761.
[12] Olah J, Orosz F, Keseru GM, *et al.* Triosephosphate isomerase deficiency: a neurodegenerative misfolding disease[J]. *Biochem Soc Trans*, 2002, 30: 30.
[13] Iori E, Millioni R, Puricelli L, *et al.* Glycolytic enzyme expression and pyruvate kinase activity in cultured fibroblasts from type 1 diabetic patients with and without nephropathy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1782: 627.
[14] Wygrecka M, Marsh LM, Morty RE, *et al.* Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung[J]. *Blood*, 2009, 113(22):5588.
[15] Kobayashi H, Takahashi M, Takahashi H, *et al.* CD4⁺ T-cells from peripheral blood of a patient with psoriasis recognize keratin 14 Deptide but not 'homologous' streptococcal M-protein epitope [J]. *J Dermatol Sci*, 2002, 30(3): 240.
[16] Freedberg M, Tomic-Canic M, Komine M, *et al.* Keratins and the keratinocyte activation cycle[J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 116(5): 633.
[17] Martinez, Azorin F, Remacha M, *et al.* Functional characterization of ribosomal P1/P2 proteins in human cells [J]. *Biochem J*, 2008, 413(3):527.
[18] Gardner-Thorpe J, Ito H, Ashley SW, *et al.* Ribosomal protein P2: a potential molecular target for antisense therapy of human malignancies[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(6C): 4549.

[收稿日期]2013-06-07

[修回日期]2013-07-10